

内切葡聚糖酶与木聚糖酶在毕赤酵母中的共分泌表达

刘高磊¹, 胡蝶², 邬敏辰^{*3}, 殷欣², 汪俊卿²

(1. 江南大学药学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学无锡医学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为实现内切葡聚糖酶和木聚糖酶在毕赤酵母中的共分泌表达, 进而降低酶制剂的生产成本, 构建含木聚糖酶基因的重组表达载体 pPICZαA-Aoxyn11A, 经 Sac I 线性化后, 电转化至含内切葡聚糖酶基因 *Aucl12A* 的重组毕赤酵母 GSC7 中, 获得双重组毕赤酵母 GSCX8。经甲醇诱导表达后, GSCX8 发酵上清液中内切葡聚糖酶和木聚糖酶的活性分别为 47.77 IU/mL 和 192.71 IU/mL, 为单独表达菌株 GSC7 和 GSX5 的 85% 和 80%。酶学性质分析显示, 内切葡聚糖酶的最适 pH 为 4.0, 在 pH 3.0~8.5 稳定; 最适温度为 50 ℃, 在 60 ℃ 以下稳定。木聚糖酶的最适 pH 为 5.5, 在 pH 3.0~10.0 稳定; 最适温度为 55 ℃, 在 50 ℃ 以下稳定。GSCX8 遗传稳定性测试结果表明, 内切葡聚糖酶和木聚糖酶在毕赤酵母中实现了稳定的共表达。

关键词: 内切葡聚糖酶; 木聚糖酶; 毕赤酵母; 共分泌表达

中图分类号: Q 814 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)03—0253—07

Co-Expression of Endoglucanase and Xylanase in *Pichia pastoris*

LIU Gaolei¹, HU Die², WU Minchen^{*3}, YIN Xin², WANG Junqing²

(1. School of Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Both endoglucanase and xylanase are additives in feed for mono-gastric animal. Co-expression of endoglucanase and xylanase in *P. pastoris* is a useful way to reduce the production cost in feedstuff industry. An endoglucanase-encoding gene (*Aucl12A*) from *Aspergillus usamii* was expressed in *P. pastoris*, and the engineering strain with the highest endoglucanase activity was labeled GSC7. Then, a recombinant vector, pPICZαA-Aoxyn11A, was constructed and linearized by Sac I, followed by transforming it into GSC7. Ultimately, the endoglucanase and xylanase genes were successfully co-expressed in *P. pastoris*. One strain harbored genes *Aoxyn11A* and *Aucl12A*, with the highest xylanase and endoglucanase activities, was labeled GSCX8. The enzymatic properties of the recombinant *Aucl12A* and *Aoxyn11A*, expressed in GSCX8, were characterized. Meanwhile, to analyze the genetic stability of GSCX8, the xylanase and endoglucanase activities of different strains

收稿日期: 2014-04-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101229; 31271811)。

* 通信作者: 邬敏辰(1962—), 男, 江苏无锡人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶工程与基因工程研究。

E-mail: biowmc@126.com

after passing 10 generations were also measured. After strain GSCX8 was induced for 96 h, the activities of recombinant *AuCel12A* and *Aoxyn11A* in the cultured supernatant were 47.77 IU/mL and 192.71 IU/mL, respectively, which were about 85% and 80% of that of enzymes expressed by the single gene engineering strains GSCZ and GSX5. The recombinant *AuCel12A* displayed the optimal activity at pH 4.0 and 50 °C, and was stable over a pH range of 3.0~8.5 and at 60 °C or below. Besides, the recombinant *Aoxyn11A* displayed the optimal activity at pH 5.5 and 55 °C, and was stable over a pH range of 3.0~10.0 and at 50 °C or below. Additionally, the activities of the two enzymes were well maintained after the GSCX8 passing 10 generations.

Keywords: endoglucanase, xylanase, *Pichia pastoris*, co-expression

内切-1,4- β -D-葡聚糖酶 (EG, endo-1,4- β -D-glucanase, EC 3.2.1.4) 是纤维素酶系的重要组成部分, 它可在纤维素链上随机切割 β -D-1,4-葡萄糖苷键生成较小相对分子质量的纤维寡糖^[1]。内切- β -1,4-D-木聚糖酶 (β -1,4-endoxylanase, EC 3.2.1.8) 通过作用于木聚糖主链内部的 β -D-1,4-木糖苷键, 将半纤维素的主要成分之一木聚糖降解为低聚木糖^[2]。两种酶在食品加工、酿酒、饲料加工, 以及生物能源等领域都有重要的应用价值^[3-4]。

在植物细胞壁中, 木聚糖和甘露聚糖等半纤维素的主要成分在纤维素周围形成复杂的网状结构, 在酶催化水解过程中, 阻碍了酶分子与底物的有效结合。然而, 在纤维素酶与半纤维素酶的联合作用下, 可在一定程度上打破空间位阻, 从而提高纤维素和半纤维素的水解率。Zhang 等^[5]研究发现, 来源于 GH11 和 GH10 家族的 2 种耐热木聚糖酶在水解麦麸时均可与纤维素酶发生协同作用。Anikó Várnai 等^[6]发现, 木聚糖酶、甘露聚糖酶和纤维素酶联合催化预处理的软木时, 多糖的总水解率远大于 3 种酶单独作用时的水解率之和。目前, 国内外已有关于构建功能相关蛋白质共表达菌株的报道, 通过将多个外源基因在同一宿主中共表达, 降低外源蛋白质的生产成本。黄生平等^[7]构建了一个双基因表达分泌质粒 pHBM907-*phyA*-*man*, 在毕赤酵母中实现了植酸酶和甘露聚糖酶的分泌表达。高秋芳等^[8]将 pPIC9K-*xyn2* 和 pPIC9K-*PelC* 质粒同时转化到毕赤酵母中, 获得了一株高效表达木聚糖酶和果胶酶的毕赤酵母菌株 PX6。

作者所在研究室前期克隆了一种来源于宇佐美曲霉 (*Aspergillus usamii*) E001 的内切葡聚糖酶基因 *Aucl12A* (GenBank 登录号: JN128871) 和一

种来源于米曲霉 (*Aspergillus. oryzae*) CICC41086 的木聚糖酶基因 *Aoxyn11A* (GenBank 登录号: XM_001823746)。本课题研究过程中将 *Aoxyn11A* 基因连接到 pPICZ α A 表达质粒上, 转化至含有 pPIC9K-*Aucl12A* 的重组毕赤酵母中, 构建双重重组毕赤酵母, 成功实现了内切葡聚糖酶和木聚糖酶的共分泌表达, 该研究进展国内尚未见报道。同时, 对重组表达的这两种酶的酶学性质及双重重组毕赤酵母的遗传稳定性进行了研究。本研究中构建了双酶表达, 降低了生产成本, 可为多个功能相关的外源蛋白质在毕赤酵母中的共表达提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养基

克隆宿主菌 *E. coli* DH5 α , 购自上海 Sangon 公司; 表达宿主菌 *P. pastoris* GS115、表达质粒 pPICZ α A, 购自 Invitrogen 公司; 重组毕赤酵母 GS115/pPIC9K-*Aucl12A*、含木聚糖酶基因 (*Aoxyn11A*) 的重组克隆质粒 pUCm-T-*Aoxyn11A*, 由作者所在实验室构建并保存。大肠杆菌生长培养基 LB 和筛选培养基低盐 LB (+Zeocin)、毕赤酵母生长培养基 YPD、转化及筛选培养基 MD、YPDS (+Zeocin) 及诱导培养基 BMGY、BMMY, 均由作者依据 Invitrogen 公司操作手册配制。

1.2 主要试剂

DNA Maker、低蛋白质分子量标准、各种限制性内切酶 (*EcoR* I、*Not* I、*Sac* I)、T4 DNA 连接酶、*rTaq* DNA 聚合酶等, 购自大连 TaKaRa 公司; 琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒, 购自 BBI 公司; Zeocin, 购自 Invitrogen 公司; 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na)、桦木木聚糖 (Beechwood xylan), 购自 Sigma 公司; 其它试

剂均为国产或进口分析纯。

1.3 重组表达质粒 pPICZαA-Aoxyn11A 的构建

以碱裂解法大量提取 pUCm-T-Aoxyn11A 和 pPICZαA 质粒,分别用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切,酶切产物经质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳后,割胶回收约 600 bp 的 *Aoxyn11A* 基因片段和约 3.6 kb 的 pPICZαA 载体片段,经 T4 DNA 连接酶 16 ℃ 连接过夜,然后转化至 DH5α 感受态细胞,利用含 25 μg/mL Zeocin 的低盐 LB 平板筛选阳性克隆。筛选的阳性克隆用通用引物 5' -AOX1 (GACTGGTTCCAATTGACAAGC) 和 3' -AOX1 (GCAAATGGCATTCTGACATCC) 进行菌液 PCR 验证,并送上海 Sangon 公司测序,测序正确的重组表达质粒命名为 pPICZαA-Aoxyn11A。

1.4 毕赤酵母细胞的电击转化及筛选

重组表达质粒 pPICZαA-Aoxyn11A 和表达质粒 pPICZαA 经 *Sac* I 单酶切使之线性化后,分别用电穿孔法转化至毕赤酵母 GS115 和重组毕赤酵母 GS115/pPIC9K-Aucel12A (命名为 GSC7) 中,转化后的菌液涂布于含 200 μg/mL Zeocin 的 YPDS 平板上,30 ℃ 条件下培养 2~3 d 至出现转化子。电转化及筛选方法参见 Invitrogen 公司操作手册。筛选到的重组毕赤酵母菌株分别命名为 GS115/pPICZαA-Aoxyn11A

和 GS115/pPIC9K-Aucel12A/pPICZαA-Aoxyn11A。

1.5 目的基因的诱导表达

从 YPDS (+Zeocin) 筛选平板上随机挑取若干重组毕赤酵母单菌落,接种于装有 30 mL BMGY 培养基的 250 mL 的三角瓶中,30 ℃、220 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 2~4,室温下 4 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,并重悬于 30 mL BMMY 培养基中,30 ℃、220 r/min 条件下诱导 96 h,每隔 24 h 补加甲醇至终体积分数为 2.0%。诱导结束后,4 ℃、8 000 r/min 离心 10 min,收集发酵上清液进行酶活性测定和 SDS-PAGE 分析。

1.6 重组毕赤酵母的基因组提取及 PCR 扩增

挑取毕赤酵母重组子单菌落接种于 YPD 液体培养基中,于 30 ℃ 条件下培养至适当浓度后,离心收集菌体,参照文献 [11] 的方法抽提酵母基因组 DNA。以提取的不同重组毕赤酵母 (GS115/pPIC9K-Aucel12A、GS115/pPICZαA-Aoxyn11A 和 GS115/pPIC9K-Aucel12A/pPICZαA-Aoxyn11A) 基因组 DNA 作为模板,分别利用引物 *celF*、*celR* 和 *xynF*、*xynR* 扩增内切葡聚糖酶基因 *Aucel12A* 和木聚糖酶基因 *Aoxyn11A*,PCR 所用引物见表 1。PCR 扩增产物经质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,检测目的基因在毕赤酵母染色体上的整合情况。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

引物名称	引物序列 (5'→3')	扩增基因	长度/bp
<i>celF</i>	GAATTCCAGACGATGTGCTCTCAAT	<i>Aucel12A</i>	686
<i>celR</i>	GCGGCCGCTAGTTGACACTGGCGGTC		
<i>xynF</i>	GAATTCTCCACACCCAGTAGCAC	<i>Aoxyn11A</i>	581
<i>xynR</i>	GCGGCCGCTCAAT AAACAGTGATAGCAG		

注:下划线部分为酶切位点

1.7 表达产物的 SDS-PAGE 鉴定

取 20 μL 诱导表达 96 h 的发酵上清液,采用质量分数 5% 的浓缩胶与质量分数 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE 梯度电泳,电泳后的蛋白胶用考马斯亮蓝 R-250 染色,脱色液脱色至蛋白质条带清晰可见,分析重组酶的分泌表达情况,并进行表观分子量的测定。

1.8 重组表达酶的活力测定

参照文献 [9-10] 的 DNS 定糖法并略做改进,测定内切葡聚糖酶和木聚糖酶的活力。2.4 mL 最适

pH 的底物溶液中,加入 100 μL 稀释适当倍数的酶液,于最适反应温度条件下孵育 15 min,反应通过加入 2.5 mL 的 DNS 试剂并煮沸 7 min 进行终止和显色,并用分光光度计测定 540 nm 处的吸光值。内切葡聚糖酶和木聚糖酶的测定底物分别为 1 g/dL 的 CMC-Na 溶液 (用 0.1 mol/L 的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液配制,pH 4.0) 和 0.5 g/dL 的榉木木聚糖溶液 (用 0.1 mol/L 的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液配制,pH 5.5)。在上述最适反应条件下,每分钟水解底物生成相当于 1 μmol 还原糖所需的酶量定义为 1 个酶活

力单位(IU),其中内切葡聚糖酶和木聚糖酶的酶活计算分别以 D-葡萄糖、D-木糖为标准单糖。

1.9 重组酶学性质分析

1.9.1 酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性 分别以 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液 (pH 3.0~7.0)、Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5~8.5)、甘氨酸-NaOH 缓冲液 (pH 9.0~10.0) 配制底物溶液,在最适反应温度下测定不同 pH 值时的酶活性,以某一 pH 值下的最高酶活为 100% 计算相对酶活,确定酶的最适反应 pH。将酶液分别用不同 pH 值 (pH 3.0~10.0) 的缓冲液稀释,40 °C 保温 1 h,冷却后在最适反应条件下测定残余酶活性,以未经 pH 处理的最高酶活力为 100% 计算相对酶活,分析酶的 pH 稳定性。

1.9.2 酶的最适反应温度及热稳定性 选取最适 pH 的底物溶液,分别在不同温度 (30~80 °C) 测定酶活性,以某一温度下的最高酶活为 100% 计算相对酶活,确定酶的最适反应温度。将酶液置于不同温度 (30~80 °C) 保温 30 min 后,立即冰浴冷却,在最适反应条件下测定残余酶活性,以未经热处理的最高酶活为 100% 计算相对酶活,分析酶的热稳定性。

1.10 双重重组毕赤酵母的遗传稳定性测试

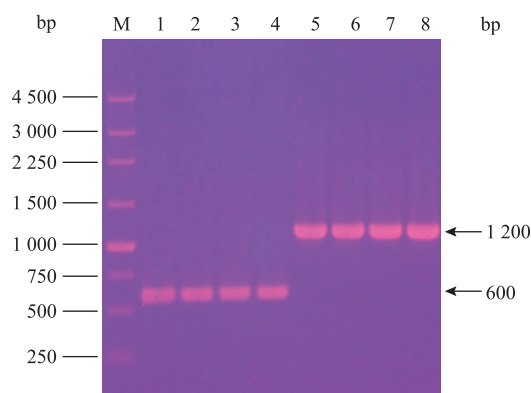
选取筛选到的双重重组毕赤酵母 GS115/pPIC9K-*Aucl12A*/pPICZ α A-*Aoxyn11A* 高产菌株,在 YPD 平板上连续划线传代培养 10 次后,分别将各代菌株以高密度摇瓶方式在体积分数 2.0% 甲醇流加量条件下诱导产酶,30 °C、220 r/min 振荡培养 96 h 后,测定发酵上清液中内切葡聚糖酶与木聚糖酶表达量,进而评价共表达毕赤酵母工程菌株的遗传稳定性。

2 结果与讨论

2.1 酵母重组表达载体的鉴定

从低盐 LB (+Zeocin) 筛选平板上挑取若干转化子,以通用引物 5'-AOX1/3'-AOX1 进行菌液 PCR 验证,质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳分析显示,阴性对照 DH5 α /pPICZ α A 的菌液 PCR 产物可见约 600 bp 的载体片段,而 DH5 α /pPICZ α A-*Aoxyn11A* 的菌液 PCR 产物可见约 1 200 bp (含载体片段约 600 bp, *Aoxyn11A* 基因片段约 600 bp) 的 DNA 片段,见图 1。说明目的基因 *Aoxyn11A* 已插入到 pPICZ α A 载体的 5'-AOX1 与 3'-AOX1 之间。测序

结果与预期相符,表明酵母重组表达载体 pPICZ α A-*Aoxyn11A* 构建正确。



M: 250 bp DNA marker; 1—4: DH5 α /pPICZ α A 的菌液 PCR 产物; 5—8: DH5 α /pPICZ α A-*Aoxyn11A* 的菌液 PCR 产物

图 1 重组大肠杆菌 DH5 α /pPICZ α A-*Aoxyn11A* 的菌液 PCR 鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant *E. coli* DH5 α /pPICZ α A-*Aoxyn11A* by bacterium liquid PCR

2.2 双重重组毕赤酵母的表达与产物分析

随机挑取 10 个 GS115/pPIC9K-*Aucl12A*/pPICZ α A-*Aoxyn11A* 菌落 (分别命名为 GSCX1—10) 和 1 个 GS115/pPIC9K-*Aucl12A*/pPICZ α A 阴性对照菌落 (命名为 GSCZ), 30 °C、体积分数 2% 甲醇流加量条件下诱导 96 h 后, 分别在最适反应条件下测定上清液中的内切葡聚糖酶和木聚糖酶活。由表 2 可知, GSCZ 的表达产物只具有内切葡聚糖酶活性, 而 GS115/pPIC9K-*Aucl12A*/pPICZ α A-*Aoxyn11A* 可同时表达内切葡聚糖酶和木聚糖酶; 其中 GSCX8 的产酶能力最强, 上清液中的内切葡聚糖酶和木聚糖酶活力分别达到 47.77 IU/mL 和 192.71 IU/mL。GSCX8 成功实现了内切葡聚糖酶和木聚糖酶在毕赤酵母中的共表达, 但两种酶的表达水平比单独表达时有所降低, 其中木聚糖酶的表达量约相当于重组酵母表达菌株 GS115/pPICZ α A-*Aoxyn11A* (命名为 GSX5, 酶活力为 233.38 IU/mL) 的 80%, 而内切葡聚糖酶的表达量约相当于阴性对照 GSCZ 和前期研究中构建的 GS115/pPIC9K-*Aucl12A* 表达量最高的菌株的 85%, 这可能与毕赤酵母有限的分泌表达外源蛋白质的能力有关^[3]。选取表达量最高的 GSC7、GSX5 和 GSCX8 菌株用于后续研究。

2.3 重组毕赤酵母的 PCR 检测

为检测目的基因是否已整合到毕赤酵母染色

体上,以重组毕赤酵母 GSC7、GSX5 及 GSCX8 的基因组为模板进行 PCR 扩增验证。

表 2 GS115/pPIC9K-Auce112A/pPICZαA-Aoxyn11A 的表达分析

Table 2 Expression analysis GS115/pPIC9K -Auce112A/pPICZαA-Aoxyn11A

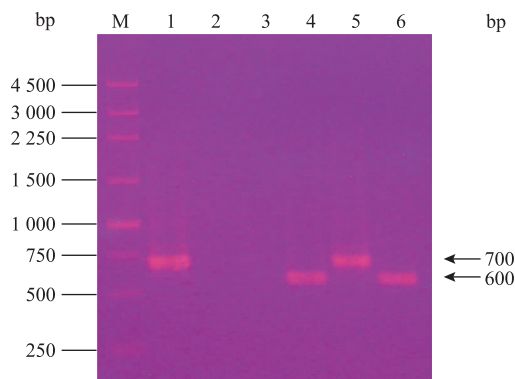
菌株命名	酶活性/(IU/mL)	
	内切葡聚糖酶	木聚糖酶
GSCX1	41.79	190.37
GSCX2	36.14	167.60
GSCX3	40.23	159.98
GSCX4	38.29	158.56
GSCX5	34.87	174.37
GSCX6	46.22	172.11
GSCX7	39.00	177.83
GSCX8	47.77	192.71
GSCX9	36.43	184.87
GSCX10	44.30	154.82
GSCZ	54.65	0

将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果显示以 GSC7 基因组为模板,利用引物 celF/celR 进行 PCR 扩增,可扩增出一条约 700 bp 的条带(图 2,泳道 1),大小与 Auce112A 基因片段一致,而利用引物 xynF/xynR 进行扩增未出现任何条带(图 2,泳道 2);以 GSX5 基因组为模板,利用引物 celF/celR 进行扩增未出现任何条带(图 2,泳道 3),而利用引物 xynF/xynR 可扩增出一条约 600 bp 的条带(图 2,泳道 4),大小与 Aoxyn11A 基因片段一致;以 GSCX8 基因组为模板,利用 celF/celR 和 xynF/xynR 两对引物可分别扩增出约 700 bp(图 2,泳道 5)和 600 bp(图 2,泳道 6)的条带,表明木聚糖酶基因 Aoxyn11A 已整合到毕赤酵母基因组中,而原有的内切葡聚糖酶基因 Auce112A 没有丢失。

2.4 表达产物的 SDS-PAGE 分析

取重组毕赤酵母 GSK(GS115/pPIC9K)、GSC7、GSZ(GS115/pPICZαA)、GSX5、GSCZ、GSCX8 的发酵上清液,用 SDS-PAGE 分析蛋白质的表达情况。结果显示,GSC7 的表达产物在相对分子质量约 27.0 kDa 处出现了一条特异性条带,大于内切葡聚糖酶的理论分子质量 24.3 kDa,内切葡聚糖酶含有一个潜在的 N 糖基化位点(N-W-T),在毕赤酵母中表达时可能会发生翻译后的糖基化修饰,因此推断该蛋白质条带为重组表达的内切葡聚糖酶;GSX5 的

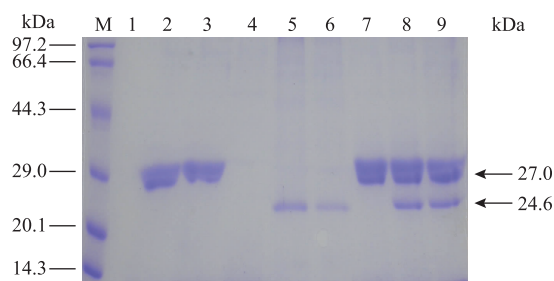
表达产物在相对分子质量约 24.6 kDa 处出现了一条特异性的蛋白质条带,与前期测得的木聚糖酶的表现分子质量相符^[12];GSCX8 的表达产物在相对分子质量约 27.0、24.6 kDa 处均可见目的蛋白质表达条带,而阴性对照 GSCZ 仅可见相对分子质量约 27.0 kDa 的特异性条带,见图 3,这与酶活测定的结果一致。



M: 250 bp DNA ladder marker; 1, 2: GSC7 的 PCR 产物; 3, 4: GSX5 的 PCR 产物; 5, 6: GSCX8 的 PCR 产物; 1, 3, 5: 引物为 celF/celR; 2, 4, 6: 引物为 xynF/xynR

图 2 重组毕赤酵母的 PCR 检测

Fig. 2 Verification of recombinant *Pichia pastoris* by PCR



M: 低相对分子质量蛋白质 maker; 1: GSK; 2, 3: GSC7; 4: GSZ; 5, 6: GSX5; 7: GSCZ; 8, 9: GSCX8

图 3 重组毕赤酵母表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expressed products by recombinant *Pichia pastoris*

2.5 酶学性质分析

用双重重组毕赤酵母 GSCX8 分泌表达的混合酶,分别对重组内切葡聚糖酶和重组木聚糖酶的酶学性质进行分析。

2.5.1 最适 pH 及其稳定性 内切葡聚糖酶的适宜作用 pH 为 pH 3.5~4.5,其相对酶活在 80%以上,其中最适作用 pH 为 4.0;木聚糖酶酶在 pH 4.5~6.5 的适宜作用 pH 条件下酶活较高(>80%),其中最适作用 pH 为 5.5,见图 4。

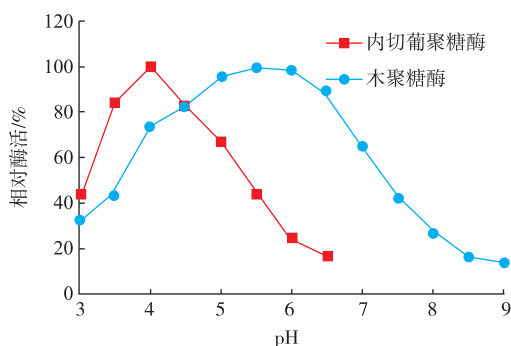


图4 内切葡聚糖酶和木聚糖酶的最适作用 pH

Fig. 4 Optimal pH profile of endoglucanase and xylanase

内切葡聚糖酶在 pH 3.0~8.5 范围内稳定,残余酶活保持在 80%以上,而木聚糖酶在 pH 3.0~10.0 内酶活均能保持稳定(>80%),见图 5。

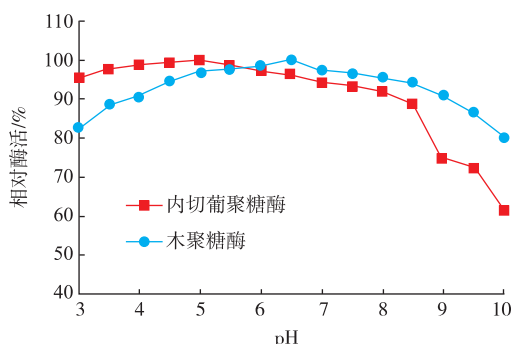


图5 内切葡聚糖酶和木聚糖酶的 pH 稳定性

Fig. 5 pH stability of endoglucanase and xylanase

2.5.2 最适反应温度及其稳定性 内切葡聚糖酶在 40~60 °C 之间酶活较高(>80%),其中最适作用温度为 50 °C; 木聚糖酶在 45~60 °C 之间活性较高(>80%),其中最适作用温度为 55 °C,见图 6。

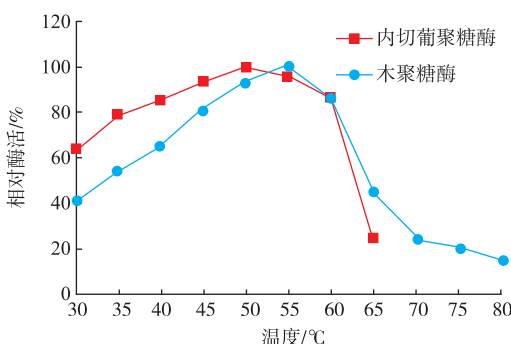


图6 内切葡聚糖酶和木聚糖酶的最适作用温度

Fig. 6 Optimal temperature of endoglucanase and xylanase

内切葡聚糖酶在 60 °C 以下酶活较稳定(>80%),65 °C 保温 30 min 后,酶活下降到 39.3%;木聚糖酶在 50 °C 以下酶活较稳定(>80%),55 °C 保温

30 min 后,酶活下降到 20.7%,见图 7。

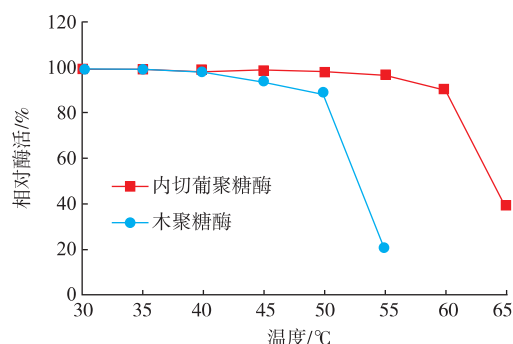


图7 内切葡聚糖酶和木聚糖酶的热稳定性

Fig. 7 Thermostability of endoglucanase and xylanase

2.6 双重重组毕赤酵母的遗传稳定性

双重重组毕赤酵母 GSCX8 经传代培养 10 次后,分别将各代菌株以摇瓶发酵方式诱导产酶 96 h,检测发酵上清液的酶活性。其中内切葡聚糖酶酶活在 43.85~49.14 IU/mL,木聚糖酶酶活 178.94~201.82 IU/mL,表明 GSCX8 在连续传代培养 10 次后,内切葡聚糖酶和木聚糖酶的表达量在各代中基本保持稳定,显示具有良好的遗传稳定性。

3 结 语

巴斯德毕赤酵母作为近年来发展迅速的真核表达系统,具有表达水平高、可分泌表达及遗传稳定等优点,将功能相关的酶基因在毕赤酵母中共表达,实现多种酶分泌表达,且重组表达的蛋白质纯度较高^[12]。在本研究中,通过双质粒体系构建了整合有 *Aucel12A* 基因和 *Aoxyn11A* 基因的双重重组毕赤酵母 GSCX8,其发酵上清液中内切葡聚糖酶和木聚糖酶的酶活性分别为 47.77、192.71 IU/mL,为单独表达菌株 GSC7 和 GSX5 酶活性的 85% 和 80%。GSCX8 经传代培养 10 次后,仍具有良好的遗传稳定性,从而实现了内切葡聚糖酶与木聚糖酶在毕赤酵母中的稳定共表达。

GSCX8 分泌表达的重组酶的酶学性质分析显示:内切葡聚糖酶和木聚糖酶具有相近的最适催化条件,从而可以在同一反应体系以复合酶的形式联合催化,从而发挥协同效应。本研究通过双质粒表达体系,实现了内切葡聚糖酶和木聚糖酶在毕赤酵母中的共表达,并对重组酶的酶学性质进行了初步研究,为新型复合酶的制备提供了有益借鉴,为进一步研究协同作用奠定了基础。

参考文献:

- [1] Deswal D, Khasa Y P, Kuhad R C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation[J]. **Bioresource Technology**, 2011, 102(10):6065–6072.
- [2] Jeya M, Thiagarajan S, Lee J K, et al. Cloning and expression of GH11 xylanase gene from *Aspergillus fumigatus* MKU1 in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2009, 108(1):24–29.
- [3] Chulkin A M, Loginov D S, Vavilova E A, et al. Cloning of the *Penicillium canescens* endo-1,4- β -glucanase gene egl3 and the characterization of the recombinant enzyme[J]. **Prikl Biokhim Mikrobiol**, 2009, 45(2):163–170.
- [4] Hui Y L, Ya R W, Jiang L, et al. Cloning, expression and characterization of a novel acidic xylanase, XYL11B, from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2009, 45(2):126–133.
- [5] Zhang J, Tuomainen P, Siika-Aho M, et al. Comparison of the synergistic action of two thermostable xylanases from GH families 10 and 11 with thermostable cellulases in lignocellulose hydrolysis[J]. **Bioresource Technology**, 2011, 102(19):9090–9095.
- [6] Anikó Várnaia, Laura H, Jaakko P, et al. Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood [J]. **Bioresource Technology**, 2011, 102(19):96–104.
- [7] 黄生平, 汪昌丽, 张桂敏, 等. 植酸酶和甘露聚糖酶双功能毕赤酵母工程菌的构建和产酶分析[J]. 微生物学报, 2007, 47(2):280–284.
HUANG Shengping, WANG Changli, ZHANG Guimin, et al. Construction of a double functional recombinant strain of *Pichia pastoris* co-expressing phytase and mannanase and the enzymatic analyses [J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2007, 47(2):280–284. (in Chinese)
- [8] 高秋芳, 郭安平, 孔华, 等. 果胶裂解酶、木聚糖酶及果胶裂解酶、木聚糖酶基因在毕赤酵母中的表达[J]. 广东农业科学, 2010(8):1–5.
GAO Qiufang, GUO Anping, KONG Hua, et al. Expression of pectin lyase gene, xylanase gene, pectin lyase gene and Xylanase gene in *Pichia pastoris*[J]. **Guangdong Agricultural Sciences**, 2010(8):1–5. (in Chinese)
- [9] Joachim K, Roland G, Heather P, et al. Determination of xylanase, β -glucanase, and cellulase activity [J]. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2002, 374(1):80–87.
- [10] Michael J B, Peter B, Kaisa P. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity [J]. **Journal of Biotechnology**, 1992, 23(3):257–270.
- [11] Connie Holm, Douglas W, Meeks Wagnerb, et al. A rapid, efficient method for isolating DNA from yeast [J]. **Gene**, 1986, 42(2):169–173.
- [12] 高树娟, 汪俊卿, 郭敏辰, 等. N端结构对米曲霉木聚糖酶热稳定性的研究[J]. 生物工程学报, 2012, 28(12):1441–1449.
GAO Shujuan, WANG Junqing, WU Minchen, et al. Effect of the N-terminal disulfide bridge on the thermostability of family 11 xylanases[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2012, 28(12):1441–1449. (in Chinese)
- [13] 吴振芳, 唐自钟, 陈惠, 等. 毕赤酵母中植酸酶和内切葡聚糖酶共表达菌株的构建及其高效表达[J]. 生物工程学报, 2010, 26(5):616–622.
WU Zhenfang, TANG Zizhong, CHEN Hui, et al. Construction of a *Pichia pastoris* recombinant strain capable of over-expressing phytase and endoglucanase[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2010, 26(5):616–622. (in Chinese)